

ПАТОГЕНЕТИЧНА РОЛЯ НА ВИРУСА НА EPSTEIN-BARR И НА CYTOMEGALOVIRUS ЗА ВЪЗНИКВАНЕ, ПОДДЪРЖАНЕ И АКТИВИРАНЕ НА СИНОВИАЛНАТА ВЪЗПАЛИТЕЛНА РЕАКЦИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИ С РЕВМАТОИДЕН АРТРИТ

Р. Шумналиева и Зл. Коларов

Клиника по ревматология, МУ – София

Резюме. В обзора са анализирани данни от изследвания на ролята на вируса на Epstein-Barr (EBV) и на cytomegalovirus (CMV) в етиопатогенезата на ревматоидния артрит. Разглежда се както корелацията между вирусните частици, изолирани от синовиалната мембрана, и антивирусните антитела в серума на болните, така и патогенетичната им роля при инициране, поддържане и форсиране на автоимунната възпалителна реакция при пациенти с ревматоиден артрит.

Ключови думи: вирус на Epstein-Barr, cytomegalovirus, ревматоиден артрит, синовиална биопсия

R. Shumnaliev and Zl. Kolarov. PATHOGENETIC ROLE OF EPSTEIN-BARR VIRUS AND CYTOMEGALOVIRUS IN INITIATION, MAINTENANCE AND ACTIVATION OF SYNOVIAL INFLAMMATORY REACTION IN RHEUMATOID ARTHRITIS

Summary. The aim of the review is to analyse the data from investigations about the role of Epstein-Barr virus (EBV) and cytomegalovirus (CMV) in the etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. It examines both the existence of correlation between viral particles isolated from synovial membrane and antiviral antibodies in the serum of patients and their pathogenetic role in initiating, maintaining and forcing the autoimmune inflammatory response in patients with rheumatoid arthritis.

Key words: Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, rheumatoid arthritis, synovial biopsy

Ревматоидният артрит (РА) е системно, автоимунно, хронично възпалително заболяване, при което водеща проява е симетричният, ерозивен артрит, предимно на периферните стави. Патоморфологично и имунохистохимично болестта се характеризира с възпаление и хиперплазия на синовиалната мембрана, разрастване на грануляционна тъкан (панус), с повишени нива на интерлевкин-1 (Interleukin-1 – IL-1), тромбоцитен растежен фактор, простагландини и субстанция Р и последваща хрущялна и костна деструкция [11].

Етиологията на заболяването е неизвестна. Обсъжда се възможността при наличие на генетично предразположение различни фактори на околната среда да участват при възникването и поддържането на болестта. На този етап е доказана връзка между носителството на алели от HLA (Human Leukocyte Antigens) системата (напр. DRB1) и извън нея (R620W, PADI, SLC22A4, FCRL3, STAT4). Проучва се ролята и на други генетични маркери, например гени, отговорни за синтеза на цитокини, участващи в патогенезата на болестта и др. [9, 14].

Един от ранните белези на РА е абнормната Т-клетъчна активация. CD4⁺ Т-клетките стимулират моноцитите и макрофагите за синтез на провъзпалителни цитокини (IL-1, IL-6, TNF-α) и протеолитични ензими, деструктуриращи синовиалната мембрана, хрущяла и подлежащата кост. Поради това РА се определя като CD4⁺ Т-хелперен тип 1 (Th1)-медирана болест [16].

Т-клетъчната инфилтрация при РА е олигоклонална. Това предполага антиген-медиран процес. Началният антиген или антигени са неизвестни. Активираните Т-клетки стимулират също В-лимфоцитите за синтез на имуноглобулини, включително ревматоиден фактор (РФ) и антитела срещу циклични цитрулинирани пептиди (аССР). По този начин автореактивните В-лимфоцити играят съществена патогенетична роля в развитието на болестта чрез синтезираните специфични автоантитела, отговорни за тъканната деструкция [1, 26].

През последното десетилетие усилено се изучава участието на микрорибонуклеиновите киселини (микроРНК) в патогенезата на РА. МикроРНК са нов клас некодирани, ендеогенни, къси молекули, за които е известно, че могат да

контролират генната експресия на посттранслационно ниво. Открита е променена експресия на микроРНК в синовиални фибробласти и синовиална тъкан от пациенти с РА [2, 22].

Цел

Целта на обзора е да се обобщят резултатите от проучванията на етиопатогенетичната роля на вирусните инфекции за възникването и протичането на РА и да се очертаят насоките за изучаване на етиопатогенезата на болестта в бъдеще.

ЕТИОЛОГИЯ НА РЕВМАТОИДНИЯ АРТРИТ

Смята се, че факторите на околната среда, които имат водещо значение за отключване, поддържане и активиране на РА, са различни инфекции, токсини (алкохол, кофеин, никотин), медикаменти (хормоналнозаместителна терапия) и др. [3, 4, 15, 27].

Едни от основните фактори на околната среда с предполагаема етиопатогенетична роля при идиопатичните автоимунни ревматични заболявания са вирусите. Основание да се подозира етиопатогенетичната им роля при РА е високата честота на възпалителни ставни прояви, от леко протичащи артралгии до остри, подостри и по-рядко хронични форми на артрит, възникващи в хода, по време или след дадена вирусна инфекция.

Ако при острите и подострите вирусни инфекции имунната система успешно елиминира патогенния антиген, то възникването и поддържането на хроничните артропатии, в частност РА, се свързва с персистиращи или латентни вирусни инфекции, вирусноиндуцирана автоимунност, поликлонална В-клетъчна активация и имуноен дефицит, последван от опортюнистични инфекции [16].

Особено внимание се обръща на възможната причинно-следствена връзка между херпесни вируси, ретровируси, парвовируси и др. Epstein-Barr (EBV) и cytomegalovirus (CMV) принадлежат към групата на човешките херпесни вируси, обозначени съответно HHV-4 и HHV-5 (Human Herpes Virus). Като представители на херпесните вируси те персistirат в инфектирания организъм до края на живота [16].

EPSTEIN-BARR ВИРУСНА ИНФЕКЦИЯ И ЕТИОПАТОГЕНЕЗА НА РА

EBV е причинител на инфекциозна мононуклеоза при човека, с честота на носителство в някои страни до 95%, с пик във възрастта между

35-40 години. При 2% от болните от инфекциозна мононуклеоза EBV причинява артралгии с продължителност до четири месеца след отзвучаване на инфекцията. Вирусът играе етиологична роля и за възникване на значителен брой туморни (назофарингеален карцином) и лимфопролиферативни заболявания (ходжкинови и неходжкинови лимфоми, лимфоми на централната нервна система). Описани са случаи на развитие на EBV-позитивни лимфоми при лекувани с метотрексат болни от РА. Изучава се и етиопатогенетичната роля на вируса при някои автоимунни заболявания, като системен лупус еритематозус и дерматомиозит/полимиозит [10].

EBV уврежда селективно В-лимфоцитите. В резултат на инфекцията настъпва т.нар. имортализация (обезсмъртяване) на В-лимфоцитите, при която инфектираните клетки не загиват, а след няколко деления броят им нараства и започват да произвеждат лимфобластoidни клетки, съдържащи вируса във вътреклетъчните си органели. При нарушен имунорегулаторен статус имортализираните В-лимфоцити излизат от контрола на Т-лимфоцитите и другите имунокомпетентни клетки, регулиращи тяхната активност, диференциация и апоптоза, и продуцират лимфомни клетки [8].

EBV-асоциираните нуклеарни антигени са шест:

1. Epstein-Barr Nuclear Antigen – EBNA (1, 2, 3a, 3b, 3c);
2. Epstein-Barr Nuclear Antigen Leader Protein – EBNA-LP;
3. ранен антиген (Early Antigen – EA) – дифузни и рестриктивни форми (R-restrictive, D-diffuse);
4. вирусен капсиден антиген (Virus Capsid Antigen – VCA);
5. EBV-индуциран мембранен антиген и
6. латентен мембранен протеин (Latent Membrane Protein – LMP) [7].

EBNA-1 е полипептид с молекулно тегло 60-85 kDa. Съдържа променлив брой повторения на връзката глицин-аланин. Задържа плазмидната вирусна ДНК в латентноинфектираните клетки и активира вирусната ДНК репликация. Експресира се във всички, инфектирани с EBV, клетки. Този механизъм не е доказан за останалите нуклеарни антигени. При латентност тип 1 е експресира само EBNA-1, който причинява неходжкинов лимфом, тип Burkitt. При латентност тип 2 се експресира LMP, който се свързва с развитието на назофарингеален карцином и EBV-позитивен ходжкинов лимфом.

EBNA-2 е полипептид с молекулно тегло 81-95-kDa, отговорен за имортализацията на В-лимфоцитите при инфектирането им с EBV.

EBNA-3a (136kDa), **3b** (142kDa) и **3c** (147kDa) са отговорни за клетъчната трансформация на първичните човешки В-лимфоцити.

LMP1 взаимодейства с рецептора на TNF- α , с което повлиява клетъчния растеж и сигналните пътища на апоптозата. Чрез активиране на антиапоптозния ген bcl-2 имортализира В-лимфоцитите [7].

EA се появява преди вирусната репликация. Дифузната форма (EA-D) се открива в ядрото, а рестриктивната (EA-R) – в цитоплазмата на инфектираните клетки.

VCA се изолират след вирусната репликация и представляват вириони (извънклетъчни форми на вируса, които не са активни). Откриват се в цитоплазмата на клетките и в ДНК [7].

EBV-индуцираните мембранни протеини са с молекулно тегло 340–350 kDa (gp350), 220 kDa (gp220), 110 kDa (gp110) и 85 kDa (gp85).

⇒ gp 350/220 се свързва с CD21 и улеснява навлизането на вируса в В-лимфоцитите чрез рецепторномедирана ендоцитоза.

⇒ gp110 се открива главно в ядрената мембрана и ендоплазмения ретикулум на инфектираната клетка. Участва в антияло зависима клетъчномедирана цитотоксичност (АЗКМЦ), което се свързва с експресия и по клетъчната мембрана.

⇒ gp85 е идентичен с херпес симплекс вирусен протеин, който улеснява сливането на вируса с клетъчната мембрана и неутрализацията му в присъствието на компоненти от системата на комплемента.

⇒ gp350 и gp85 са таргети за вирус-неутрализиращите антитела. gp350 е отговорен за АЗКМЦ и Т-клетъчномедирания отговор и потиска вирусното освобождаване от клетката. Сред вирусните антигени той е най-проучваният за създаване на антивирусна ваксина [6, 7].

Характерно за инфекциите, предизвикани от EBV, е персистирането им в организма и поддържането на латентна инфекция с чести рецидиви. Цикълът на вирусна инфекция протича в две фази.

През *лизисната фаза* се синтезират инфекциозни вириони, които не нарушават функцията на инфектирания В-лимфоцит. През тази фаза се повишава експресията на гени, кодиращи вирусните протеини gp350 и gp110.

През *латентната фаза* не се синтезират вириони. Повишава се синтезът на определени вирусни протеини, като EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-LP, LMP-1, LMP-2A и LMP-2B, Epstein-Barr вирус-кодирани рибонуклеинови киселини (PHK) – Epstein-Barr Virus-Encoded Small RNAs (EBERs) и минимум 20

микроPHK, които се експресират в латентноинфектираните клетки.

Отговорът на организма към инфекцията с EBV е синтез на антитела, различни през различните фази на вирусната инфекция. През инкубационния период и ранната (мононуклеарната) фаза на вирусна инфекция се синтезират антитела срещу вирусния капсиден антиген (VCA) и ранния антигенен комплекс – дифузна форма (EA-D). Няколко седмици или месеци след началната инфекция се синтезират антитела срещу EBV нуклеарен антиген (EBNA) и ранен антигенен комплекс-рестриктивна форма (EA-R). Антителата срещу EBNA-2 се появяват рано и изчезват постепенно, последвани от повишаване на титъра на EBNA-1 антителата, които персistirат до края на живота, т.е. латентната EBV инфекция се асоциира с умерени, постоянни и силно корелиращи нива на антителата срещу VCA, EBNA-1 и EA-R и много нисък или липсващ титър на антителата срещу EBNA-2 и EA-D [7, 14].

Много често, при спадане на имунитета, вирусът се реактивира, като преминава от латентна в лизисна фаза. В тези случаи титърът на антителата срещу VCA, EBNA-2 и EA (анти-VCA IgG, анти-EBNA-2 антителата, анти-EA-антитела) се покачват. Това е показател за вирусна реактивация.

Корелацията между серологичните промени при инфекцията с EBV и равнищата на вирусна репликация се доказва чрез полимеразноверижна реакция (Polymerase Chain Reaction – PCR). В латентната фаза вирусът се размножава и разпространява, независимо от наличието или липсата на вирусни антитела. Титърът на антителата корелира по-скоро с вирусната активност, отколкото с антивирусната защита.

Ролята на EBV в патогенезата на РА се изучава от години. Предполага се, че връзката на инфекцията с EBV и развитието на заболяването може да се обясни с теорията за молекулярна мимикрия, повлияването на Т-клетъчния рецептор за антигени, общи епитопи на EBV с антигени от HLA системата или чрез синтез на автоантитела срещу ставни протеини. Доказателство за участието на EBV в етиопатогенезата на РА е откриването на по-високи нива на антителата срещу някои вируснокодирани протеини (VCA, EA, EBNA-1, EBNA-2) при пациенти със заболяването, сравнени с резултатите при здрави контроли. Наличието на РФ в тези слу-

чаи не се свързва с изброените кодиращи протеини. Освен това товарът на вирусна ДНК в мононуклеарни клетки от периферна кръв е 10 пъти по-висок в сравнение с контролните здрави лица. Нивата на вирусната ДНК са стабилни и не зависят от наличието на РФ, възрастта на болните, продължителността и активността на болестта и от лечението. Нивата на вирусна ДНК и мРНК в синовиалната течност на болни от РА са по-високи от тези на контролите. Синовиалният товар с вирусна ДНК е най-висок при болни с поне едно копие на HLA-DRB1 общ епитоп (водещия генетичен рисков фактор за развитие на РА). Вирусният протеин gp110 съдържа аминокиселинна последователност (QKRAA), която съответства на третия вариабилен регион от HLA-DRB1 алелите, асоциирани с РА [14].

Голяма част от CD8+Т-лимфоцити, инфилтриращи синовиалната ревматоидна мембрана, разпознават EBV трансактивационни фактори (BZLF-1 и BMLF-1), които изпълняват съществена роля при контрола на вирусната реактивация. Носителството на HLA-DR4, генетичен маркер за РА, е свързано с ниски равнища на Т-лимфоцитите и специфичния за EBV gp110 гликопротеин – също съществени фактори за контрола на вирусната инфекция. При болните от РА е наблюдавано клонално разрастване на CD8+ CD28-EBV-специфични Т-лимфоцити. Предполага се, че те са стари, нефункциониращи Т-супресорни клетки, появили се под влиянието на рекурентна EBV вирусна стимулация и/или вследствие на първичен дефект на Т-клетъчната диференциация и пролиферация при РА [17, 20, 24].

EBV персистира в В-лимфоцитите и кодира минимум два протеина, които участват в процесите на клетъчна апоптоза – BHFR-1 (вирусен хомолог на антиапоптозния протеин bcl-2) и LMP-1. Смята се, че регулацията на В-клетъчната апоптоза е съществен фактор за синтез на аССР антитела [6, 14].

СУТОМЕГАЛОВИРУС И ЕТИОПАТОГЕНЕЗА НА РА

CMV е друг ДНК вирус, принадлежащ към групата на човешките херпесни вируси (HHV-5). Заразяването с CMV може да стане интраутеринно, перинатално или постнатално, транссексуално, парентерално или при органна трансплантация. При постнаталното заразяване най-често инфекцията протича асимптомно. CMV инфекция може да доведе до развитие на продължителен фебри-

литет, лек хепатит, често с ангина и атипична лимфоцитоза. Клиничната картина е подобна на тази при инфекция с EBV, с това изключение, че лимфаденопатията не е честа и тестът на Paul-Bunnell е отрицателен [12, 13].

При имунокомпрометирани болни инфекцията с CMV може да протече с фебрилитет, със/без хепатит, пневмония (с леталитет до 80-90%), ретинит, чревна инфекция с улцерации и хеморагии, CMV-индуциран имunosупресивен синдром с последващи опортюнистични инфекции и др.

След тази *ранна фаза* на инфекция вирусът остава в организма в *латентна фаза*. Реактивацията може да се наблюдава при спад на имунитета след прием на медикаменти, при инфекции или с напредване на възрастта.

CMV може да бъде открит в телесните течности – урина, слюнка, кръв, семенна течност и кърма, на всеки заразен индивид.

През ранната фаза на вирусна инфекция се синтезират IgM антитела, които персistirат 3-4 месеца. CMV IgG антитела се синтезират по време на първичната инфекция и персistirат в организма до края на живота [12, 16].

Лабораторната диагностика на CMV инфекция се извършва чрез:

1. Изолиране на вируса от телесни течности и тъкани:

- Изследване на клетъчни култури – използват се човешки ембрионални фибробласти от бял дроб. Изолатите се инокулират в „безсмъртни“ HeLa (Henrietta Lacks) клетки за 28 дни. CMV причинява типичен фокален цитопатичен ефект (увреждане на вътреклетъчните органели и клетъчните мембрани).

- DEAFF (детекция на ранни антиген-флуоресциращи фокуси) – за ранна диагноза на CMV, със сензитивност и специфичност при имунокомпрометирани болни, съответно 78% и 100%. Изолатите се инокулират в клетъчни култури, които след 24 часа се изследват с имунофлуоресценция за експресия на CMV кодиращи ранни протеини.

- Хистопатологично – търсене на CMV включения, изглеждащи като „око на бухал“.

- Тъканна имунофлуоресценция – инфектирани чернодробни или белодробни клетки или материал от бронхоалвеоларен лаваж се оцветяват със специфични CMV антитела.

- Електронна микроскопия.

- Засичане на вирусна ДНК чрез PCR – бърз и сензитивен метод за засичане на вируса.

- CMV-антигенемия тест – бърз метод (в рамките на същия ден), базиран на засичане на pp65, структурен протеин, експресиран по повърхността на инфектираните полиморфонуклеарни левкоцити. Броят на инфектираните левкоцити корелира с тежестта на инфекцията [13].

2. Серологични методи за доказване на вирусни антигени или антитела.

Използват се методи, регистриращи реакцията антиген-антитяло, при което има две възможности: да се търси антигенът чрез тест-антитяло (серум или моноклонално антитяло) или да се търси антитялото чрез тест-антиген. Методите могат да се провеждат качествено или количествено. Качественият метод установява само наличието или липсата на антигена (антитялото), докато количественият метод показва и неговата концентрация.

- Латекс-аглоутинация – метод за засичане реакцията антиген-антитяло чрез образуване на аглутинат, видим с невъоръжено око. При добавяне на специфично антитяло към суспензия, то свързва антигена и се образуват големи агрегати (аглутинати), които се утаяват на дъното на плаката. При разклащане суспензията не се възстановява, а се получават отделни плътни частици от аглутинирани клетки. Поради голямата си и многовалентна молекула добре аглутинират антителата от клас IgM. В някои случаи и антителата от клас IgG могат да предизвикат аглоутинация.

- RIA (radioimmunoassay) е количествен метод за установяване на антитела и други биологичноактивни съединения (хормони, невропептиди), които се намират в серума в много ниска концентрация.

- ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), познат и като ензимен имунотест – EIA. Това е специфичен метод за засичане реакцията антиген-антитяло чрез използване на белязани антитела. Бележи се не самото антитяло, което реагира с антигена и се нарича първично антитяло, а специално полученото антиимуноглобулиново диагностично антитяло, което реагира с първото антитяло и се нарича вторично. Свързано е със специфичен лизиращ ензим. Полученият ензимен субстрат се разгражда от ензима – реакция, която се отчита и определя като положителна. ELISA тестовете за CMV антиген в

урина са с ниска специфичност, тъй като CMV е свързан с β 2-microglobulin в урината [13, 16].

Анти-CMV IgM антителата се установяват при първичната инфекция и се задържат 3-4 месеца. Не се установяват при рекурентна инфекция, с изключение при имунокомпрометирани болни (при повече от 1/3 от тях). При тези болни по време на ранната инфекция може да не се установи CMV-IgM. При изследването им се използват ELISA, RAI, латекс-аглоутинация.

Анти-CMV IgG-антителата се синтезират рано, още при първичната инфекция, и персистират до края на живота. Установяването на IgG служи за скрининг на имунния статус (серопозитивните индивиди не са защитени срещу реактивация на вируса и съответно – от реинфекция). Повишаването на титъра на IgG антителата е маркер за активна инфекция. Изследването им е необходимо при диагноза на рекурентна инфекция или при имунокомпрометирани болни, които не синтезират IgM антитела при първичната инфекция. За детекция на анти-CMV IgG антителата се използват различни методи, като латекс-аглоутинация, ELISA, RIA.

Желателно е серологичните тестове да бъдат допълнени и подкрепени с изследване на вирусни култури. Това се отнася преди всичко за имунокомпрометирани болни, при които имунният отговор е намален или липсващ. Възможно е анти-CMV IgG антитела да бъдат пренесени чрез кръвни продукти и да дадат грешнопозитивни резултати [12, 13, 16].

МЕТОДИ ЗА ДОКАЗВАНЕ НА ВИРУСНА ДНК/РНК

Основните методи за доказване на вирусна ДНК/РНК са:

- PCR – високоспецифична техника в молекулярната биология за умножаване на единични или няколко копия на ДНК, с последващ синтез на хиляди или милиони копия на съответните последователности на изследваната ДНК.

PCR идентифицира „некултивируеми“ или бавнорастящи микроорганизми, като микобактерии, анаеробни бактерии или вируси от тъкани култури или животински модели. Базата за диагностичната PCR амплификация в микробиологичната практика е установяването на инфекциозни агенти и разграничаването на патогенни от непатогенни видове чрез специфични гени.

Вирусната ДНК може да се установи с PCR. Олигонуклеотидните сегменти (праймери), необходими за началото на реакцията, трябва да съответстват на последователностите на изследваната вирусна ДНК. PCR може да се използва за нуждите на диагностичната практика или за разчитане на последователностите на вирусната ДНК. Високоспецифичната PCR може да установи наличието на вируса в изследваните тъкани или биологични течности непосредствено след инфектирането на организма, преди клиничната изява на болестта. Също така броят на вирусите (вирусният товар) при даден болен може да се оцени чрез ДНК количествени методи, основани на PCR.

• ISH (in situ hybridization) – диагностичен лабораторен метод, при който се установяват специфични ДНК/РНК последователности чрез съответстващи ДНК/РНК последователности в части (срезове) от изследваните тъкани (in situ) или в целия биоптат (цялостен ISH), когато количеството на изследваната тъкан е малко. За визуализиране на реакцията може да се използва и флуоресценция (FISH). Чрез имунохистохимичен анализ се търсят специфични протеини в изследваните тъкани [12].

МЯСТО НА СИНОВИАЛНАТА БИОПСИЯ ПРИ ДИАГНОСТИЦИРАНЕ НА РА

Диагнозата РА се основава на клинични, серологични и рентгенологични данни. Синовиалната биопсия не се възприема като рутинен диагностичен метод при РА. Прилага се при диагностично неясни артрити, някои неясни, ранни форми на артрит, съмнение за малигнени процеси. Най-често се биопсират големи (колени) стави и по-рядко малки и средни стави – интерфалангеални, метакарпофалангеални стави на ръцете и краката, гривнени и глезенни стави и т.н. Използват се максимално щадящи техники, като иглена биопсия под ехографски контрол. Изследването на синовиалната тъкан със съвременни методи и технологии от молекулярната биология и биохимия допринася за изясняването на непознати до момента детайли от патогенезата на болестта. Научната и клиничната стойност на метода се повишават при съпоставяне на патоанатомичните хистологични данни с данните от неинвазивните диагностични методи – имунологични изследвания, образни

методи (ядрено-магнитен резонанс, единична фотонноемисионна компютърна томография, 2D артросонография с висока резолюция и позитронноемисионна компютърна томография).

Синовиалната биопсия се извършва чрез отворена артротомия, артроскопия, сляпа или под ултразвуков контрол иглена биопсия. Методът не влияе върху хистологичната находка. Вземането на биопсичен материал под ултразвуков контрол е сравнително нов метод за получаване на биопсичен материал от малки и големи стави и сухожилни влагалища чрез индиректна визуализация [19].

Процедурата е безопасна. В многоцентрово проучване с над 15 000 артроскопии, проведени от ревматолози, са съобщени 0.9% хемартрози, 0.1% раневи или ставни инфекции и 0.2% дълбока венозна тромбоза. Процентът на различните видове усложнения е нисък.

В клинични проучвания синовиалната биопсия се прилага за изясняване патогенезата на болестта, механизма на действие и резултатите от лечението с различни терапевтични агенти. В тази насока показателни са данните, че промени в синовиалната хистология, отчитащи броя на CD68 позитивни макрофаги, корелират с ефективността на лечението, отчетена с DAS28 [25].

Има проучвания, които изследват връзката между наличието на вирусна ДНК в синовиалната на пациенти с РА и възникването на заболяването чрез изследване на синовиални биоптати.

Някои автори отричат ролята на херпесните вируси в патогенезата на болестта. Резултатите от проучване на L. Zhang и сътр. (1993) за търсене честотата на херпес вирусна инфекция при болни от различни възпалителни ставни заболявания, в т.ч. и РА, не подкрепят участието на херпесните вируси в патогенезата на РА. Авторите изследват лимфоцити от периферна кръв и синовиална течност чрез PCR за търсене на вирусна ДНК. В клетки от синовиална течност и периферна кръв на болните от РА авторите намират EBV ДНК с честота съответно 19% и 39% при болните от реактивен артрит (ReA) – 33% и 39%, в периферна кръв при болни с други артропатии – 27% и при здравите контроли – 31%. Авторите подчертават високата честота на EBV ДНК, но считат, че са необходими други отключващи фактори за появата на болестта, и не приемат, че РА се дължи на инфекцията с EBV и персистирането на EBV ДНК в тъканите на болния [28].

През 2000 г. H. D. Stahl и сътр. търсят вирусна ДНК на различни ДНК вируси (CMV, EBV, HSV, Parvovirus B19) в синовиалната мембрана и синовиалната течност на болни с ранен артрит чрез PCR. Изследвайки синовиална течност и синовиална тъкан на 73 болни с ранен артрит, авторите откриват вирусна ДНК на единичен или множество вируси, независимо от диагностичната специфичност на артритите. Те обясняват този факт с миграция на възпалителни клетки, носители на вирусна ДНК, във възпалените тъкани [21].

S. Sawada и съавт. чрез хибридизация *in situ* на синовиални покривни клетки и имунопероксидазен метод за търсене на експресия на CD21 позитивна молекула (EBV рецептор), EBNA-2 и LMP-1 откриват EBV кодирана малка РНК (EBER) при 23.5% от 34 болни от РА и при нито един ($p < 0.05$) болен с остеоартроза (ОА) и псориазичен артрит (ПсА). При това EBER, локализирана в синовиалните покривни клетки, е открита на върха на вилозните пролиферативни лезии, подобно на LMP-1, докато CD19, CD20 молекулите и EBNA-2 не се установяват в тези лезии. Честотата на EBV-позитивни синовиални покривни клетки с голяма инфилтрация от лимфоцити е по-висока от тази със средна инфилтрация. Това е първото доказателство, че EBV присъства в синовиални покривни клетки при хронично възпалените стави на болни от РА [18].

M. Mousavi-Jazi и сътр. (1998) изследват биоптат от синовиална мембрана при 31 болни от РА и 14 здрави лица чрез PCR за наличие на ДНК на няколко херпесни вируса – EBV, CMV, HSV-1 и -2, VZV (Varicella Zoster Virus) и HHV-6. Специфичните антивирусни антитела са определени чрез индиректна имуофлуоресценция и ELISA. ДНК на CMV и на EBV е установена в синовиалната мембрана при 6% от болните от РА. В биоптатите на болните не е установена ДНК от HSV-1 и 2, VZV и HHV-6. Всички PCR тестове на здравите лица за носителство на вирусна ДНК са негативни. Не са установени сигнификантни разлики в равнищата на IgG антителата за CMV, HSV-1, VZV и HHV-6 при болните от РА в сравнение със здравите. По-високи титри на IgG антителата срещу EBV капсиден антиген са установени при болните в сравнение със здравите, като разликата е сигнификантна – $p < 0.05$ [13].

В проучване на T. Takeda и сътр. (2000) е изследвана синовиална тъкан на 32 болни от РА

и 30 от ОА. ДНК от EBV е изследвана със Southern Blot хибридизация и/или PCR амплификация. За локализиране на инфектираните клетки с EBV тъканните срезове са изследвани за EBV-кодираната малка RNA1 (EBER-1) чрез РНК-ISH, за BamHI W региона от EBV ДНК чрез ДНК-ISH, и за EBV-литични протеини BZLF1 и gp350/220 чрез имунохистохимични методи. Вирусна ДНК е установена при 15 от 32 болни и при нито един от болните от ОА. От 15-те PCR-позитивни материала 9 съдържат над 1 EBV копие на 1000 клетки и 6 съдържат 1 EBV копие на 1000-5000 клетки. Сред 9-те позитивни случая 3 са позитивни за EBV-ДНК, изследвана чрез Southern Blot хибридизация, 5 – позитивни за EBER-1 чрез РНК-ISH и 3 – позитивни за EBV-ДНК чрез ДНК-ISH. Имунохистохимичният анализ дава позитивни сигнали при всички изследвани болни за BZLF1 и в 7 материала за gp350/220. Позитивни резултати са засечени не само в лимфоцитите, но и в синовиалните покривни клетки. Тези данни дават основание на авторите да предположат, че EBV играе етиопатогенетична роля за възникването и прогресирането на възпалителната ставна реакция при РА [23].

В проучване на J. G. Saal и сътр. (1999) за връзката между наличието на EBV вирусна ДНК в синовиални клетки и носителството на определени HLA епитопи авторите съобщават, че EBV вероятно играе роля на фактор на околната среда за възникване на РА при наличието на HLA-DRB1 алел в генотипа на болния. Чрез PCR са изследвани клетки от синовиална тъкан при 84 болни от РА и 81 болни от артрит, различен от РА, като контролна група за търсене на вирусна ДНК. Авторите откриват, че при позитивните за EBV ДНК индивиди рискът за отключване на РА е значително по-висок, в сравнение с EBV ДНК негативните лица. Носителството на определени HLA-DRB1 алели повишава значително този риск, в сравнение с индивидите, при които липсват вирусна ДНК и цитираните HLA-DRB1 алели [17].

Чрез PCR, ДНК-ISH (CMV), EBER1/2-РНК-ISH (EBV) и имунохистохимично Y. Mehraein и сътр. (2004) доказват повишено присъствие на EBV, CMV и B19 вирусна ДНК в синовиална тъкан при 63 болни (29 с РА, 6 с ПсА, 26 с РеА и 2 здрави). Латентна EBV инфекция на синовиалните покривни клетки, синовиалните фибробласти и/или инфилтриращите лимфоцити е ус-

тановена при 5/29 (17.2%) от РА, 1/6 (16.7%) от ПсА и при много по-малко случаи с РеА. ДНК на CMV е установена при 31% от болните от РА, 3/6 % от ПсА и 11.5% от РеА. Имунохистохимичният анализ на CMV ранен антиген показва репликативна CMV активност при 20.7% от болните от РА и 2/6 (33.3%) от ПсА, но не и в синовия от РеА. Сравнителни анализи между EBV, CMV и В19 показват, че случаите с двойна или множествена вирусна инфекция са много повече при РА и ПсА, отколкото при РеА [12].

Изяснявайки патогенетичната роля на инфекцията с ДНК вируси при РА, М. Вокарева и сътр. (2008) синтезират двойноверижна РНК като прототип на вирусна структура от нуклеинови киселини, която е силно артритогенна при мишки. Чрез ELISA авторите търсят двойноверижна РНК в серума и синовиалната течност на болни от РА и от остеоартроза и установяват сигнификантно по-висока честота на двойноверижната РНК в серум и синовиална течност при болните от РА, в сравнение с болни от ОА. Нивата на двойноверижната РНК са значително по-високи при болните от РА с костни ерозии, в сравнение с болните без ерозии [5].

Данните от проучванията за възможната етиопатогенетична роля на херпес-вирусните инфекции при РА са противоречиви. Необходими са още изследвания за доказване или отхвърляне на хипотезата за тяхното вероятно участие в патогенезата на болестта. Въпрос без отговор до момента е възможността имунологичните промени при РА да са резултат или причина за развитието на болестта. Необходими са още по-точни и прецизни методи с висока специфичност и сензитивност за установяване на вирусна ДНК и вирусни антигени преди клиничната изява на артритата, за да се отговори на въпроса, дали вирусната инфекция в синовиалната мембрана е първична, или вторична.

Библиография

1. Коларов, Зл. Съвременни аспекти в патогенезата на ревматоидния артрит, С., УИ „Св. Кл. Охридски“, 1999, 7-151.
2. Шумналиева, Р., Зл. Коларов и Р. Рашков. МикроРНК – нови биомаркери при автоимунните ревматични заболявания. – Ревматология, 19, 2011, № 1, 22-31.
3. Alsalahy, M. et al. Effect of tobacco smoking on tissue protein citrullination and disease progression in patients with rheumatoid arthritis. – Saudi Pharm. J., 18, 2010, № 2, 75-80.
4. Baka, Z., E. Buzás et G. Nagy. Rheumatoid arthritis and smoking: putting the pieces together. – Arthritis Res. Ther., 11, 2009, № 4, 238.
5. Bokarewa, M. et al. Arthritogenic dsRNA is present in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients with an erosive disease course. – Eur. J. Immunol., 38, 2008, № 11, 3237-3244.
6. Fox, R. et al. Potential role of Epstein-Barr virus in Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis. – J. Rheumatol. Suppl., 32, 1992, 18-24.
7. Gordadze, A., D. Poston et P. Ling. The EBNA2 polyproline region is dispensable for Epstein-Barr virus-mediated immortalization maintenance. – J. Virol., 76, 2002, № 14, 7349-7355.
8. Humme, S. et al. The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold. – PNAS, 100, 2003, № 19, 10989-10994.
9. Lee, H. et al. Genetics risk factors for rheumatoid arthritis differ in Caucasian and Korean populations. – Arthritis Rheum., 60, 2009, № 2, 364-371.
10. Lockey, T. et al. Epstein-Barr virus vaccine development: a lytic and latent protein cocktail. – Front. Biosci., 13, 2008, № 5, 5916-5927.
11. Mac Gregor, A. et A. Silman. Rheumatoid Arthritis: Classification and Epidemiology. ed. Klippel and Dieppe. – In: Rheumatology, 2nd ed., 1998, № 5, 2-3.
12. Mehraein, Y. et al. Latent Epstein-Barr virus (EBV) infection and cytomegalovirus (CMV) infection in synovial tissue of autoimmune chronic arthritis determined by RNA- and DNA-in situ hybridization. – Mod. Pathol., 17, 2004, № 7, 781-789.
13. Mousavi-Jazi, M. et al. Infrequent detection of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA in synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. – J. Rheumatol., 25, 1998, № 4, 623-628.
14. Ollier, W. Rheumatoid arthritis and Epstein-Barr virus: a case of living with the enemy. – Ann. Rheum. Dis., 59, 2000, 497-499.
15. Pedersen, M. et al. Environmental risk factors differ between rheumatoid arthritis with and without autoantibodies against cyclic citrullinated peptides. – Arthritis Res. Ther., 8, 2006, № 4, 133.
16. Perl, A. Mechanisms of viral pathogenesis in rheumatic disease. – Ann. Rheum. Dis., 58, 1999, 454-461.
17. Saal, J. et al. Synovial Epstein-Barr virus infection increases the risk of rheumatoid arthritis in individuals with the shared HLA-DR4 epitope. – Arthritis Rheum., 42, 1999, № 7, 1485-1496.
18. Sawada, S. et M. Takei. Epstein-Barr virus etiology in rheumatoid synovitis. – Autoimmun. Reviews, 4, 2005, № 2, 106-110.
19. Scirè, C. et al. Immunohistological assessment of the synovial tissue in small joints in rheumatoid arthritis: validation of a minimally invasive ultrasound-guided synovial biopsy procedure. – Arthritis Res. Ther., 9, 2007, 101.
20. Scotet, E. et al. T cell response to Epstein-Barr virus transactivators in chronic rheumatoid arthritis. – J. Exp. Med., 184, 1996, № 5, 1791-1800.
21. Stahl, H. et al. Detection of multiple viral DNA species in synovial tissue and fluid of patients with early arthritis. – Ann. Rheum. Dis., 59, 2000, № 5, 342-346.

22. Stanczyk, J. et al. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. – *Arthritis Rheum.*, 58, 2008, № 4, 1001-1009.
23. Takeda, T. et al. Lytic Epstein-Barr virus infection in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. – *Arthritis Rheum.*, 43, 2000, № 6, 1218-1225.
24. Tan, L. et al. Specificity of T cells in synovial fluid: high frequencies of CD8(+) T cells that are specific for certain viral epitopes. – *Arthritis Res.*, 2, 2000, № 2, 154-164.
25. Vordenbäumen, S. et al. Utility of synovial biopsy. – *Arthritis Res. Ther.*, 11, 2009, № 6, 256.
26. Wase, I. et al. Oligoclonal T cell proliferation in patients with rheumatoid arthritis and their unaffected siblings. – *Arthritis Rheum.*, 39, 1996, № 6, 904-913.
27. Westhoff, G., R. Rau et A. Zink. Rheumatoid arthritis patients who smoke have a higher need for DMARDs and feel worse, but they do not have more joint damage than non-smokers of the same serological group. – *Rheumatology*, 47, 2008, № 6, 849-854.
28. Zhang, L. et al. Detection of herpesviruses by polymerase chain reaction in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. – *Arthritis Rheum.*, 36, 1993, № 8, 1080-1086.

Постъпил за печат на 9 юни 2011 г.

✉ *Адрес за кореспонденция:*

Д-р Р. Шумналиева
Клиника по ревматология
Медицински университет
ул. "Урвич" № 13
1612 София

✉ *Address for correspondence:*

R. Shumnaliev, M. D.
Clinic of Rheumatology
Medical University
13, Urvitch Str.
Bg – 1612 Sofia